



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101942425 B

(45) 授权公告日 2012.06.20

(21) 申请号 201010261968.1

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2010.08.24

C12N 7/01 (2006.01)

(73) 专利权人 北京农学院

C12N 15/11 (2006.01)

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇北农路
7 号

C12P 7/26 (2006.01)

审查员 朱宁

(72) 发明人 马兰青 王有年 师光禄 于寒松
张继星

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

序列表 13 页 附图 3 页

(54) 发明名称

与苯亚甲基丙酮合成相关的酶及其编码基因
与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种与苯亚甲基丙酮合成相关的酶及其编码基因与应用。本发明提供的蛋白质，是如下 1) 或 2) 的蛋白质：1) 由序列表中的序列 4 的氨基酸残基序列组成的蛋白质；2) 将序列表中的序列 4 氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与苯亚甲基丙酮合成相关由 1) 衍生的蛋白质。本发明的实验证明，将本发明采用定点突变 (C197L/G256L/S338I) 技术对 PcPKS2 进行了突变研究，PcPKS2 的三联体突变体命名为 PcmBAS，结果显示，突变后的 PcmBAS 苯亚甲基丙酮合成能力较 PcPKS2 提高了 7.52 倍。

1. 一种蛋白质,是由序列表中的序列 4 的氨基酸残基序列组成的蛋白质。
2. 权利要求 1 所述蛋白质的编码基因。
3. 根据权利要求 2 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为序列表中序列 3 所示的 DNA 分子。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组载体、重组菌或表达盒。
5. 根据权利要求 4 所述的重组载体,其特征在于:所述重组载体为将权利要求 2 或 3 所述编码基因插入载体 pET-30b(+) 的多克隆位点间得到的重组载体。
6. 权利要求 1 所述蛋白质在合成苯亚甲基丙酮中的应用,或权利要求 2 或 3 所述编码基因在合成苯亚甲基丙酮中的应用。
7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于:所述合成苯亚甲基丙酮为体外合成苯亚甲基丙酮。
8. 一种制备苯亚甲基丙酮的方法,其特征在于:为以 4- 香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物,在权利要求 1 所述蛋白质的催化作用下,得到苯亚甲基丙酮。

与苯亚甲基丙酮合成相关的酶及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种与苯亚甲基丙酮合成相关的酶及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 覆盆子酮,又名悬钩子酮(raspberry ketone),化学名为 4-对羟基苯基-2-丁酮, (4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone),是一种经过美国食用香料制造者协会(FEMA)和欧洲理事会(COE)共同认可使用的一种具有幽雅果香香韵的安全食用香料,其FEMA编号为2588,属于国家海关承认、产业政策鼓励发展的高新技术产品,其被广泛用于食品、化妆品及医药中间体的合成。作为覆盆子果实特征性香味物质,在覆盆子植物中含量低并且资源非常有限,从植物中提取天然覆盆子酮是不经济的,天然提取的覆盆子酮成本高达每公斤2万美元。

[0003] 在自然界中,覆盆子酮广泛存在于悬钩子属植物覆盆子中。覆盆子,今称树莓,为悬钩子属,蔷薇科,半灌木,小浆果类。覆盆子可做水果食用,其红熟果称树莓果,口感香、甜、酸,可鲜食,在欧美是一种极具营养价值和经济价值的高端水果,在中国少为人知,仅在东北地区有少量栽培,市场上比较少见。覆盆子同时具有很高的药用价值;其绿果经炮制制成传统中药覆盆子,《本草纲目》等文献记载具有“气味甘,平,无毒”,有益肾固精缩尿壮阳作用。

[0004] 覆盆子酮是一种酚类化合物,其生物合成来源于聚酮化合物生物合成途径,苯亚甲基丙酮合酶(Benzalacetone synthase(BAS))(EC 2.3.1.-)催化 4-香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 分子通过一步脱羧缩合反应生成苯亚甲基丙酮(p-hydroxyphenylbut-3-ene-2-one),之后苯亚甲基丙酮再还原酶的催化下直接生成覆盆子酮。BAS 是植物类型 III 聚酮合酶(PKS)超家族成员,在构建具有重要药理价值的一系列苯丁烷类化合物及其衍生物物的C₆-C₄分子骨架方面具有重要的功能。BAS 是覆盆子酮生物合成途径的关键酶和限速酶,是利用基因工程技术分子调控覆盆子酮生物合成的靶点。BAS 在覆盆子植物中一直未得到分离,但在蓼科植物掌叶大黄(Rheum palmatum)中得到分离。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供与苯亚甲基丙酮合成相关的酶及其编码基因与应用。

[0006] 本发明提供的蛋白质,人工合成,命名为 PcmBAS,是如下 1) 或 2) 的蛋白质:

[0007] 1) 由序列表中的序列 4 的氨基酸残基序列组成的蛋白质;

[0008] 2) 将序列表中的序列 4 氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与苯亚甲基丙酮合成相关的由 1) 衍生的蛋白质。

[0009] 上述序列 4 由 389 个氨基酸残基组成,上述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加为不超过 10 个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0010] 所述蛋白质的编码基因 PcmBAS 也是本发明保护的范围。

[0011] 所述编码基因为如下 1)-5) 中任一所述的 DNA 分子:

- [0012] 1) 序列表中序列 3 所示的 DNA 分子；
- [0013] 2) 序列表中序列 3 自 5' 末端第 4 位到第 1167 位核苷酸所示的 DNA 分子；
- [0014] 3) 序列表中序列 3 自 5' 末端第 1 位到第 1167 位核苷酸所示的 DNA 分子；
- [0015] 4) 在严格条件下与 1) 或 2) 或 3) 限定的 DNA 序列杂交且编码与苯亚甲基丙酮合成相关的蛋白所示的 DNA 分子；
- [0016] 5) 与 1) 或 2) 或 3) 限定的 DNA 序列至少具有 70%、至少具有 75%、至少具有 80%、至少具有 85%、至少具有 90%、至少具有 95%、至少具有 96%、至少具有 97%、至少具有 98% 或至少具有 99% 同源性且编码与苯亚甲基丙酮合成相关的蛋白所示的 DNA 分子。
- [0017] 上述序列 3 由 1167 个核苷酸组成, OFR 的序列为序列 3 的自 5' 末端第 1-1167 位核苷酸序列。
- [0018] 所述严格条件可为在 $0.1 \times \text{SSPE}$ (或 $0.1 \times \text{SSC}$), 0.1% SDS 的溶液中, 在 65°C 下杂交, 并用该溶液洗膜。
- [0019] 含有上述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系、表达盒或重组病毒也是本发明保护的范围。
- [0020] 所述重组载体为将上述编码基因插入载体 pET-30b(+) 的 NdeI 和 SalI 识别位点间得到的重组载体。
- [0021] 扩增上述编码基因全长或任一片段的引物对也是本发明保护的范围; 所述引物对如下所示: 一条引物序列如序列表中序列 5 所示, 另一条引物序列如序列表中序列 6 所示。
- [0022] 上述蛋白质在合成苯亚甲基丙酮中的应用, 上述编码基因在合成苯亚甲基丙酮中的应用都是本发明要保护的范围。所述合成苯亚甲基丙酮为体外合成苯亚甲基丙酮。
- [0023] 本发明另一个目的是提供一种制备苯亚甲基丙酮的方法。
- [0024] 本发明提供的方法, 为以 4- 香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物, 在权利要求 1 所述蛋白质的催化作用下, 得到苯亚甲基丙酮。
- [0025] 本发明的实验证明, 将本发明采用定点突变 (C197L/G256L/S338I) 技术对 PcPKS2 进行了突变研究, PcPKS2 的三联体突变体命名为 PcmBAS, 结果显示, 突变后的 PcmBAS 苯亚甲基丙酮合成能力较 PcPKS2 提高了 7.52 倍。PcmBAS 突变基因及其应用为覆盆子酮的生物合成提供了直接有效的技术及应用基础。

附图说明

- [0026] 图 1 为 PcmBAS 原核表达载体的构建
- [0027] 图 2 为原核表达载体的 NdeI 和 SalI 双酶切鉴定
- [0028] 图 3 为 BAS 纯化 SDS-PAGE 分析
- [0029] 图 4 为 BAS 催化合成苯亚甲基丙酮高效液相色谱 (HPLC) 测定结果

具体实施方式

- [0030] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。
- [0031] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。
- [0032] 实施例 1、PcPKS2 定点突变的获得
- [0033] 1. PcPKS2 的定点突变

[0034] 人工合成 PcPKS2 (序列表中的序列 1)。PcPKS2 的定点突变 (C197L/G256L/S338I) 采用 QuikChange site-directed mutagenesis kit (购自 Stratagene, Catalog #200518) 试剂盒方法, 具体突变引物如下 (突变位点用下划线标出): PcPKS2C197T/G256L/S338I (5' -CATCGTTTGTCTCGGAGATGACGGCAATTACATTCCGTGGGCCATCTGAAACAAAC-3', 5' -GAATCCGATGGTGCAGTCGAGTTACATTTGCTCGAATCTGGGCTTAGTTGCC-3' and 5' -CAAGTGTTGAACGACTATGGAAACATGATTAGTGCTACTGTGTTTTTCATCATG-3'), 模板为人工合成 PcPKS2, 进行 PCR 扩增, 将得到的 PCR 产物送去测序, 结果表明, 该 PCR 产物具有序列表中序列 3 的序列, 该 PCR 产物的基因命名为 PcmBAS, OFR 为序列表中序列 3 的第 1-1170 位核苷酸, PcmBAS 编码的蛋白命名为 PcmBAS, 该蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列 4。PcmBAS 与 PcPKS2 (序列 2) 相比, 突变位点为: 第 197 位由 Cys (半胱氨酸) 突变为 Leu (亮氨酸), 第 256 位由 Gly (甘氨酸) 突变为 Leu (亮氨酸), 第 338 位由 Ser (丝氨酸) 突变为 Ile (异亮氨酸)。PcmBAS 与 PcPKS2 相比, 突变位点为第 583-585 位由 TGC 突变为 ACA, 第 760-762 位由 GGC 突变为 TTA, 第 1006-1008 位 TCA 突变为 ATT。

[0035] 2. PcmBAS 异源表达和蛋白纯化

[0036] PcmBAS cDNA 的 ORF 使用含有特定限制性内切酶位点的 N-末端和 C-末端引物进行 PCR 扩增。正义引物为: 5'-TATACATATGGCGGCTTCAATTGAGGAGATT-3' (序列 5), 下划线表示 NdeI 酶切位点; 反义引物为: 5'-TATAGTCGACCTAATGAATGATGGGCACGCTGCG-3' (序列 6), 下划线表示 SalI 酶切位点。以步骤 1) 获得的 PCR 产物 (或人工合成序列 3) 为模板, 进行 PCR, 得到的 PCR 产物经过 NdeI/SalI 双酶切后得到的片段, 插入原核表达载体 pET-30b (+) (Novagen, Darmstadt, Germany) 的 NdeI 和 SalI 的识别位点间, 获得重组载体 (图 1 为载体结构示意图), 将重组载体用 NdeI 和 SalI 酶切鉴定, 结果如图 2 (M, DL15000+2000 Marker; 1-3, 阳性质粒。) 所示, 从图中看出, 得到约 1.2Kb 的 DNA 片段。将酶切鉴定结果正确的重组阳性质粒测序, 该重组载体为在 pET-30b (+) 的 NdeI 和 SalI 的识别位点插入序列表中序列 3 的第 4-1167 位核苷酸构成, 将该阳性重组载体命名为 pET-30b (+)-PcmBAS。

[0037] 将 pET-30b (+)-PcmBAS 转入 E. coli BL21-Rosetta (DE3) (TransGen, Beijing, China) 中, 获得重组菌, 将重组菌提取质粒后酶切鉴定, 获得约 1.2Kb 片段的重组菌命名为 BL21/pET-30b (+)-PcmBAS。

[0038] 将 BL21/pET-30b (+)-PcmBAS 接入 10ml 含有卡那霉素 ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) 和氯霉素 ($34 \mu\text{g ml}^{-1}$) 的 LB 培养基, 37°C 培养过夜, 次日稀释 100 倍接入 200ml LB 培养基中于 37°C 、200rpm 继续培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8 时, 添加终浓度为 1mM 的 IPTG, 降温至 30°C , 6h 后, 通过离心收集菌体并重悬于 3ml 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 超声波冰上破碎菌体。冰上破碎的菌体匀浆于 4°C 10,000g 下离心 10min, 收集上清。

[0039] 上清通过 Ni^{2+} -琼脂糖柱 (Novagen)。用含有 0.5M NaCl and 40mM 咪唑 (imidazole) 的 0.1M 磷酸钾缓冲液洗涤 Ni^{2+} -琼脂糖柱三次后, 用含有 400mM imidazole 的 0.1M 磷酸钾缓冲液洗涤洗脱, 收集洗涤洗脱液, 为了长期保持重组蛋白活性, 再将洗涤洗脱液通过 PD-10 柱 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 用含 10% (v/v) 甘油的 0.1M Tris-HCl (pH 7.5) 置换缓冲液重新洗脱, 收集洗脱液, 得到重组蛋白 PcmBAS, 保存于 -80°C 。

[0040] 重组蛋白的纯化效率用 SDS-PAGE 检测。

[0041] 采用同样的方法将 PcPKS2 导入大肠杆菌 BL21 中, 获得重组菌 BL21/pET-30b(+)-PcPKS2, 再将该重组菌采用上述方法发酵、纯化获得重组蛋白 PcPKS2。

[0042] 采用同样的方法将空载体 pET-30b(+) 导入大肠杆菌 BL21 中, 获得重组菌 BL21/pET-30b(+), 再将该重组菌采用上述方法发酵、纯化获得对照组蛋白。

[0043] 组氨酸六聚体标签构筑在重组蛋白的 C 末端上。将上述纯化得到的重组蛋白 PcmBAS 和 PcPKS2 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 以上述获得的对照组蛋白为对照, 结果如图 3(M, 分子质量标准; 1, PcmBAS 纯化结果; 2, PcPKS2 纯化结果) 所示, 结果显示纯化的重组蛋白 PcmBAS 和 PcPKS2 均在 43kDa 的位置上形成一个单一条带, 这与 PcmBAS 和 PcPKS2 的预期大小一致, 说明蛋白纯化成功。对照组蛋白中未有目的蛋白条带。

[0044] 实施例 2、突变体的功能研究

[0045] 1、体外酶促反应及产物分析

[0046] 250 μ l 标准体外酶促反应体系含有 150 μ M 的 4- 香豆酰辅酶 A(Beuerle T, Pichersky E(2002)Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme esters. Anal Biochem 302:305-312; 公众可从北京农学院获得。)、280 μ M 丙二酰辅酶 A(Sigma-Aldrich Catalog #M4263)、0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 9.0) 以及 2.0 μ g 的由实施例 1 获得的重组蛋白 PcmBAS, 反应体系的 pH 值为 9.0。上述反应体系置于 30℃ 下 30 分钟后, 加入终浓度为 5% 的乙酸 (检测副产物), 之后用 250 μ l 的乙酸乙酯抽提并于 10,000g 下离心 10 分钟。取上清真空干燥后, 加入 50 μ l 50% (v/v) 的甲醇水溶液。以实施例 1 获得的重组蛋白 PcPKS2 和对照组蛋白为对照。

[0047] 酶促产物的分析使用配备有 Kromosil C18 反相柱 (5 μ m, 250mm $\times$ 4.6mm; Macherey Nagel) 的 Waters Alliance 2695 高效液相色谱系统 (HPLC) 完成。流动相为水 (A) 和甲醇 (B), 流速为 0.6ml min⁻¹, 使用以下梯度条件: 30% B 3 分钟、30-70% B 27 分钟、70-80% B 2 分钟、80-95% B 3 分钟以及 95% B 5 分钟。检测波长针对以下化合物分别为: 柚皮素查儿酮 (naringenin chalcone), 289nm; 苯亚甲基丙酮 (p-hydroxybenzalacetone), 323nm。用相应的标准品: 柚皮素查尔酮 (Catalog #W530098, 购自 Sigma-Aldrich 公司) 和苯亚甲基丙酮 (Catalog#11960, 购自 Sigma-Aldrich 公司), 对各种化合物进行定量。

[0048] 对于高效液相色谱-质谱分析, 液相分离由 Shimadzu LC-10ADvp HPLC 系统完成。质谱测定由 Shimadzu LCMS-2010A 质谱系统完成 (Shimadzu, Kyoto, Japan)。Shimadzu LC/ESIMS-2010 软件系统完成数据采集和处理。液相色谱条件同前述。最适的质谱条件如下: 所有的 m/z 波普范围设定在 120-350; 干燥气体流速, 1.5L min⁻¹; CDL 温度, 250℃; block 温度, 200℃; probe 电压 +4.5kV。

[0049] 酶动力学常数及催化效率 (绝对活性) (Kcat/Km) 是最准确的酶活性指标。

[0050] 苯亚甲基丙酮标准品的保留时间为 31.7 分钟, 酶促产物的定性及定量分析结果见图 4 所示 (A 为 PcPKS2 催化结果; B 为 PcmBAS 催化结果), 结果显示, PcmBAS 催化生成苯亚甲基丙酮的保留时间为 31.7 分钟, PcPKS2 催化生成苯亚甲基丙酮的保留时间为 31.7 分钟。对照组蛋白没有得到苯亚甲基丙酮, 表明其没有酶活性。

[0051] 质谱检测结果为苯亚甲基丙酮标准品的分子量为 146.19, PcmBAS 催化生成苯亚甲基丙酮的分子量为 146.19, PcPKS2 催化生成苯亚甲基丙酮的分子量为 146.19, 表明, 得

到的物质为苯亚甲基丙酮。

[0052] 重组的 PcmBAS 与 4- 香豆酰辅酶 A 和 丙二酰辅酶 A 共同在标准酶促反应体系中孵育且酶促反应体系 pH 值为 9.0 时, PcmBAS 能够高效地生成苯亚甲基丙酮为主产物, 且活性远高于 PcPKS2。

[0053] 证明 :PcmBAS 为苯亚甲基丙酮合成酶。

[0054] 2、动力学分析

[0055] 重组蛋白动力学常数的测定是在丙二酰辅酶 A 浓度饱和 (浓度为 $280\ \mu\text{M}/1$) 的情况下, 用 4- 香豆酰辅酶 A 介于其 K_m 的 0.2-6.0 范围内的 5 个浓度值进行计算获得。

[0056] 实验使用上述标准的 $250\ \mu\text{l}\ 0.1\text{M}$ 磷酸钾缓冲液反应体系, 每个实验重复 3 次。反应体系的 pH 值为 9.0, 上述反应体系置于 30°C 下 30 分钟后, 加入终浓度为 5% 的乙酸, 之后用 $250\ \mu\text{l}$ 的乙酸乙酯萃取, 将有机相于 $10,000\text{g}$ 下离心 10 分钟。取上清真空干燥后, 加入 $50\ \mu\text{l}\ 50\%$ (v/v) 的甲醇水溶液。

[0057] K_m 和 K_{cat} 值由 Lineweaver-Burke 曲线的结果得出。

[0058] 对于苯亚甲基丙酮的合成, PcPKS2 的动力学常数为 : $K_m = 46.7\ \mu\text{M}$ 、 $K_{cat} = 0.24\text{min}^{-1}$ (4- 香豆酰辅酶 A) ; PcmBAS 的动力学常数为 : $K_m = 35.7\ \mu\text{M}$ 、 $K_{cat} = 1.38\text{min}^{-1}$ (4- 香豆酰辅酶 A) 。突变体 PcmBAS (K_{cat}/K_m) 较 PcPKS2 催化效率提高 7.52 倍, PcmBAS 突变基因及其应用为覆盆子酮的生物合成提供了直接有效的技术及应用基础。

[0001]

序列表

<110> 北京农学院

<120> 与苯亚甲基丙酮合成相关的酶及其编码基因与应用

<130> CGGNACB102614

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1170

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223>

<400> 1

```
atggcggctt caattgagga gattaggaag gaacaaacac ccgtacggt cctggccatc 60
ggcaccgcc aacctccaa ttgcttatac caagccgact ttcccgacta ttacttcgc 120
atcaccaaga gtgatcacct caccacctc aagcaaaaat tcaagcgcat ttgtgagaat 180
tcaaggatag agaagcgta cttcaattg accgaagaga ctatcaagga aaacccaaac 240
attggtgcct acgaggcacc atcattaaat gcaagacaca aaattcaagt gaaaggagtt 300
gcagagcttg ggaaagaggc tgccctcgag gccatcaaag aatggggcca acctaaagtct 360
aagatcacac atctcatcgt gtgttgctta gccggtgttg acatgccggg cacagattat 420
caactcacta aactacttga ccttcacctc actgttaaac gctttatgtt ttaccaccta 480
ggatgttatg clggtggcac tgtacttcgc cttgcaaagg acatagctga gaacaataag 540
ggagctcgtg ttctcatcgt ttgctcggag atgacggcaa tttgcttcg tgggccatct 600
gaaacaaaca tatcctccat gatagggaca tcggtattag gtgatggggc tgcagcagtc 660
atagttggcg cgaatccgga cctgactgtt gagaggccca tcttcgagtt ggtttgaca 720
```

[0002]

```

gcccaaacta ttgtacccga atccgatggt gcagtcgagg gccatttgct cgaatctggg    780
cttagttgcc atttgtccaa gactcttccc gtactaatct ctaataacat cgaagcctgc    840
ctttcagagg ctttcacccc actaaacatt agcgattgga actccctatt ctggatcacg    900
caccctgggt gccctgctat cctggaccat gttgaagccg ccaccggtct caacaaggag    960
aaacttaagg caactagaca agtgttgaac gactatggaa acatgtcaag tgctactgtg   1020
tttttcatca tggataagat gaggaagagg tcgcttgaaa atggtcgagc aaccactgga   1080
gaaggactgg agtgggggtgt tttgtttgga atcgggcccg gcgttactgt cgaaactgtg   1140
gtgctacgca gcgtgcccac cattcattag                                1170

```

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

<213> 1

<400> 2

Met Ala Ala Ser Ile Glu Glu Ile Arg Lys Glu Gln Thr Pro Ala Thr

1 5 10 15

Val Leu Ala Ile Gly Thr Ala Asn Pro Pro Asn Cys Leu Tyr Gln Ala

20 25 30

Asp Phe Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Ile Thr Lys Ser Asp His Leu Thr

35 40 45

[0003]

His Leu Lys Gln Lys Phe Lys Arg Ile Cys Glu Asn Ser Arg Ile Glu

50

55

60

Lys Arg Tyr Phe Gln Leu Thr Glu Glu Thr Ile Lys Glu Asn Pro Asn

65

70

75

80

Ile Gly Ala Tyr Glu Ala Pro Ser Leu Asn Ala Arg His Lys Ile Gln

85

90

95

Val Lys Gly Val Ala Glu Leu Gly Lys Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ile

100

105

110

Lys Glu Trp Gly Gln Pro Lys Ser Lys Ile Thr His Leu Ile Val Cys

115

120

125

Cys Leu Ala Gly Val Asp Met Pro Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Thr Lys

130

135

140

[0004]

Leu Leu Asp Leu His Pro Thr Val Lys Arg Phe Met Phe Tyr His Leu
145 150 155 160

Gly Cys Tyr Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys Asp Ile Ala
165 170 175

Glu Asn Asn Lys Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Cys Ser Glu Met Thr
180 185 190

Ala Ile Cys Phe Arg Gly Pro Ser Glu Thr Asn Ile Ser Ser Met Ile
195 200 205

Gly Thr Ser Val Leu Gly Asp Gly Ala Ala Ala Val Ile Val Gly Ala
210 215 220

Asn Pro Asp Leu Thr Val Glu Arg Pro Ile Phe Glu Leu Val Trp Thr
[0005]

225	230	235	240
Ala Gln Thr Ile Val Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Glu Gly His Leu			
	245	250	255
Leu Glu Ser Gly Leu Ser Cys His Leu Ser Lys Thr Leu Pro Val Leu			
	260	265	270
Ile Ser Asn Asn Ile Glu Ala Cys Leu Ser Glu Ala Phe Thr Pro Leu			
	275	280	285
Asn Ile Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Trp Ile Thr His Pro Gly Gly			
	290	295	300
Pro Ala Ile Leu Asp His Val Glu Ala Ala Thr Gly Leu Asn Lys Glu			
305	310	315	320

[0006]

Lys Leu Lys Ala Thr Arg Gln Val Leu Asn Asp Tyr Gly Asn Met Ser

325

330

335

Ser Ala Thr Val Phe Phe Ile Met Asp Lys Met Arg Lys Arg Ser Leu

340

345

350

Glu Asn Gly Arg Ala Thr Thr Gly Glu Gly Leu Glu Trp Gly Val Leu

355

360

365

Phe Gly Ile Gly Pro Gly Val Thr Val Glu Thr Val Val Leu Arg Ser

370

375

380

Val Pro Ile Ile His

385

<210> 3

<211> 1167

<212> DNA

<213> 人工合成

[0007]

<220>

<223>

<400> 3

atggcggctt caattgagga gattaggaag gaacaaacac ccgctacggt cctggccatc	60
ggcaccgcca accctcccaa ttgcttatac caagccgact ttcccgacta ttacttccgc	120
atcaccaaga gtgatcacct caccacctic aagcaaaaat tcaagcgcac ttgtgagaat	180
tcaaggatag agaagegtta ctttcaattg accgaagaga ctatcaagga aaacccaaac	240
attggtgcct acgaggcacc atcattaaat gcaagacaca aaattcaagt gaaaggagtt	300
gcagagcttg ggaaagaggc tgccctcgag gccatcaaag aatggggcca acctaagtct	360
aagatcacac atctcatcgt gtgttgctta gccgggtgtg acatgccggg cacagattat	420
caactcacta aactacttga cttcaccct actgttaaac gcitttatgtt ttaccaccta	480
ggatgttatg ctggtggcac tgtacttccg cttgcaaagg acatagctga gaacaataag	540
ggagctcgtg ttctcatcgt ttgctcggag atgacggcaa ttacattccg tgggccatct	600
gaaacaaaca taccctccat gatagggaca tcggtattag gtgatggggc tgcagcagtc	660
atagttggcg cgaatccgga cctgactgtt gagaggccca tcttcgagtt ggtttggaca	720
gccccaaacta ttgtaccgga atccgatggt gcagtcgagt tacatttgct cgaatctggg	780
cttagttgcc atttgtccaa gactcttccc gtactaatct ctaataacat cgaagcctgc	840
ctttcagagg ctttcacccc actaaacatt agcgattgga actccctatt ctggatcacg	900
caccctggtg gccctgctat cctggaccat gttgaagccg ccaccggtct caacaaggag	960
aaacttaagg caactagaca agtgttgaac gactatggaa acatgattag tgctactgtg	1020

[0008]

tttttcatca tggataagat gaggaagagg tcgcttgaaa atggtcgagc aaccactgga	1080
gaaggactgg agtgggggtgt ttgttttggga atcggggcccg gcgttactgt cgaaactgtg	1140
gtgctacgea gcgtgcccac cattcat	1167

<210> 4

<211> 389

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223>

<400> 4

Met Ala Ala Ser Ile Glu Glu Ile Arg Lys Glu Gln Thr Pro Ala Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Leu Ala Ile Gly Thr Ala Asn Pro Pro Asn Cys Leu Tyr Gln Ala

20	25	30
----	----	----

Asp Phe Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Ile Thr Lys Ser Asp His Leu Thr
[0009]

35

40

45

His Leu Lys Gln Lys Phe Lys Arg Ile Cys Glu Asn Ser Arg Ile Glu

50

55

60

Lys Arg Tyr Phe Gln Leu Thr Glu Glu Thr Ile Lys Glu Asn Pro Asn

65

70

75

80

Ile Gly Ala Tyr Glu Ala Pro Ser Leu Asn Ala Arg His Lys Ile Gln

85

90

95

Val Lys Gly Val Ala Glu Leu Gly Lys Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ile

100

105

110

Lys Glu Trp Gly Gln Pro Lys Ser Lys Ile Thr His Leu Ile Val Cys

115

120

125

[0010]

Cys Leu Ala Gly Val Asp Met Pro Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Thr Lys

130

135

140

Leu Leu Asp Leu His Pro Thr Val Lys Arg Phe Met Phe Tyr His Leu

145

150

155

160

Gly Cys Tyr Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys Asp Ile Ala

165

170

175

Glu Asn Asn Lys Gly Ala Arg Val Leu Ile Val Cys Ser Glu Met Thr

180

185

190

Ala Ile Thr Phe Arg Gly Pro Ser Glu Thr Asn Ile Ser Ser Met Ile

195

200

205

Gly Thr Ser Val Leu Gly Asp Gly Ala Ala Ala Val Ile Val Gly Ala

210

215

220

[0011]

Asn Pro Asp Leu Thr Val Glu Arg Pro Ile Phe Glu Leu Val Trp Thr

225

230

235

240

Ala Gln Thr Ile Val Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Glu Leu His Leu

245

250

255

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Cys His Leu Ser Lys Thr Leu Pro Val Leu

260

265

270

Ile Ser Asn Asn Ile Glu Ala Cys Leu Ser Glu Ala Phe Thr Pro Leu

275

280

285

Asn Ile Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Trp Ile Thr His Pro Gly Gly

290

295

300

Pro Ala Ile Leu Asp His Val Glu Ala Ala Thr Gly Leu Asn Lys Glu

305

310

315

320

[0012]

Lys Leu Lys Ala Thr Arg Gln Val Leu Asn Asp Tyr Gly Asn Met Ile

325

330

335

Ser Ala Thr Val Phe Phe Ile Met Asp Lys Met Arg Lys Arg Ser Leu

340

345

350

Glu Asn Gly Arg Ala Thr Thr Gly Glu Gly Leu Glu Trp Gly Val Leu

355

360

365

Phe Gly Ile Gly Pro Gly Val Thr Val Glu Thr Val Val Leu Arg Ser

370

375

380

Val Pro Ile Ile His

385

<210> 5

<211> 31

[0013]

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223>

<400> 5

tatacatatg gcggcttcaa ttgaggagat t

31

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223>

<400> 6

tatagtcgac ctaatgaatgatg ggcacgctgc g

34

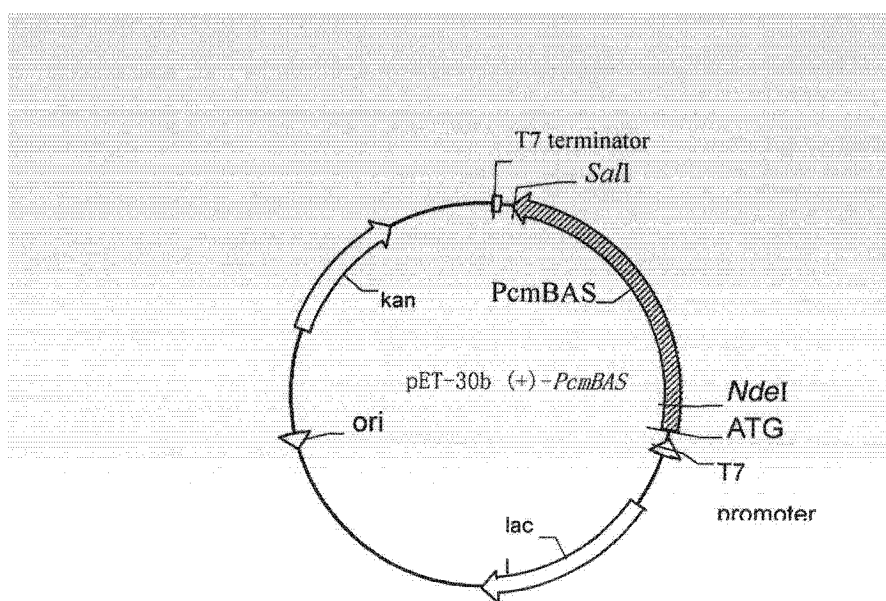


图 1

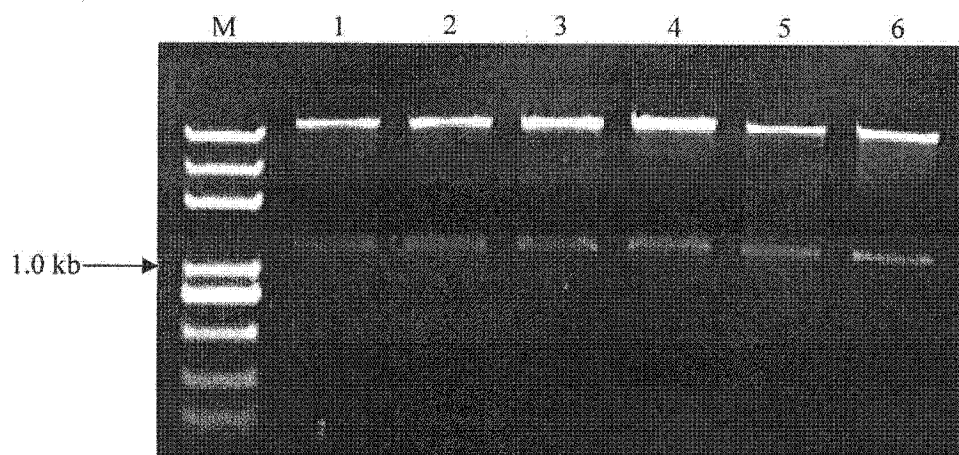


图 2

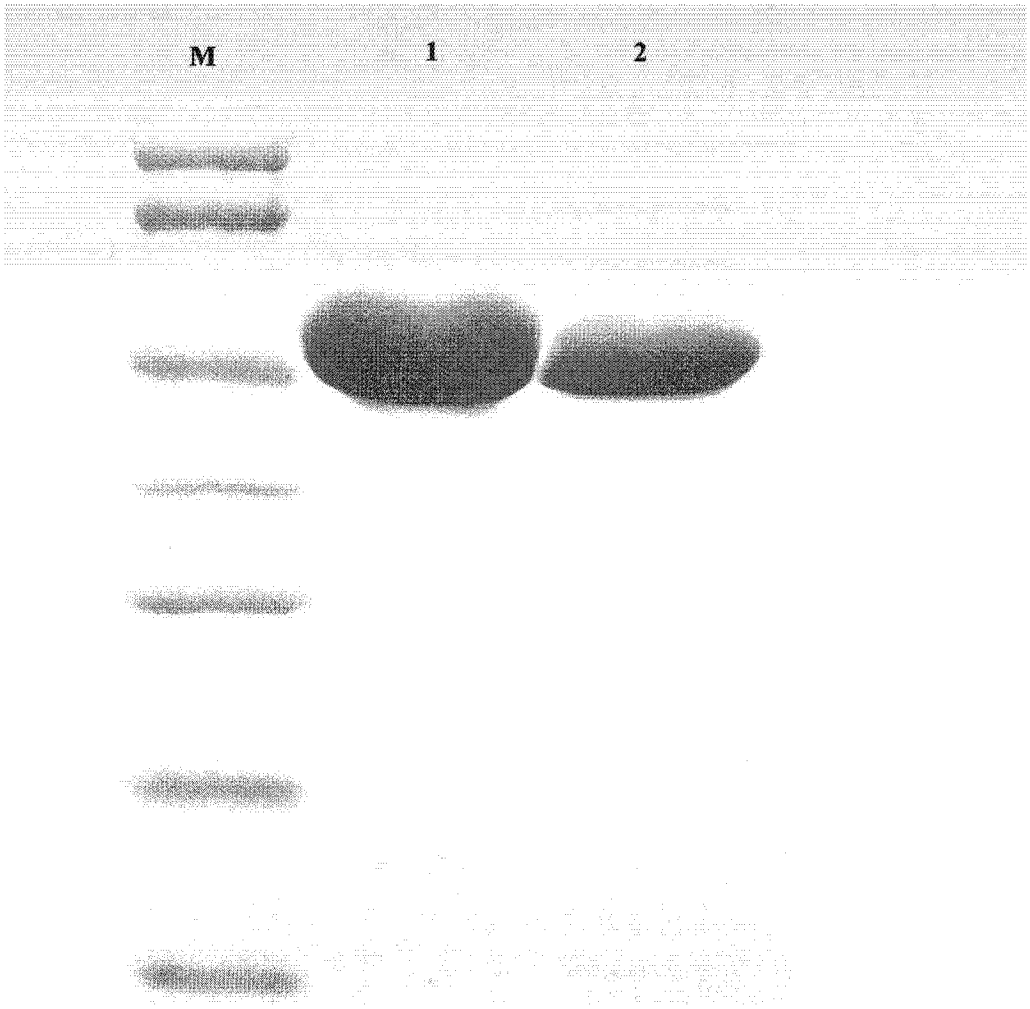


图 3

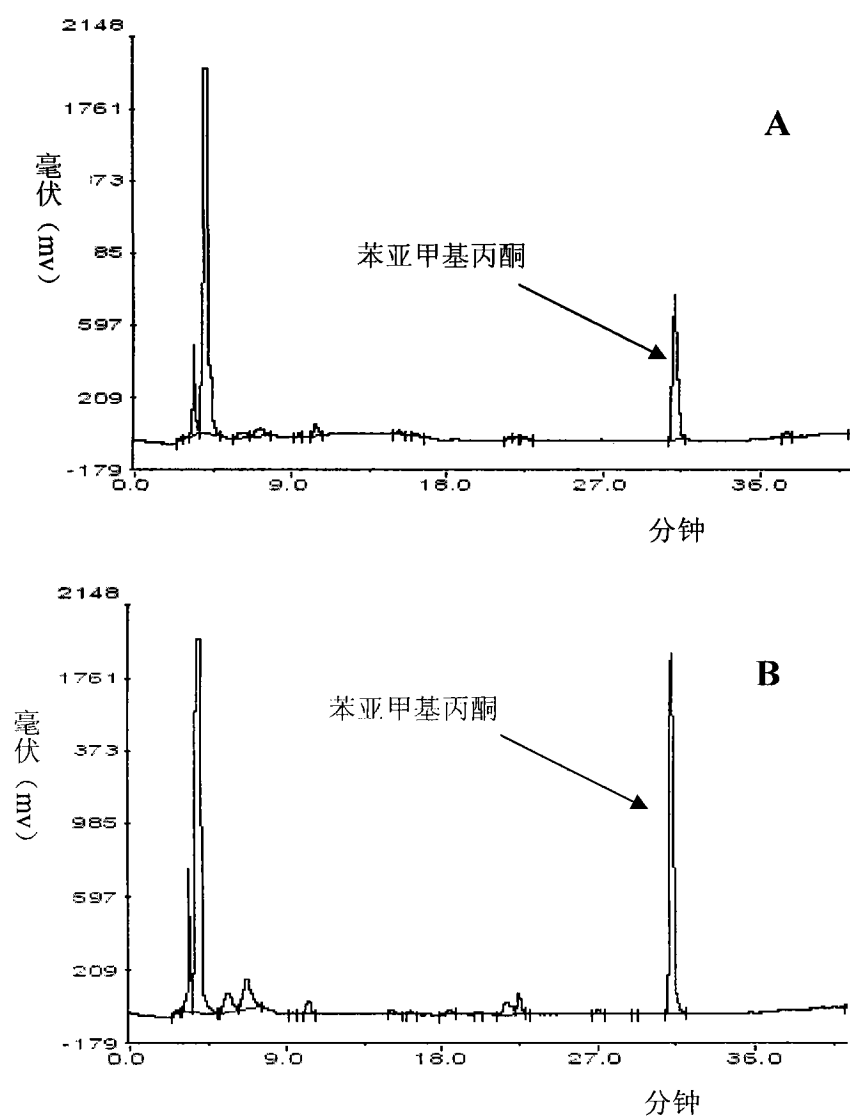


图 4